「リアルタイムPCRによる クリプトスポリジウム、ジアルジア検出」

クリプトスポリジウム（*Cryptosporidium parvum*等）は胞子虫類に属する原虫で感染源は「オーシスト」になり、ジアルジア（*Giardia lamblia*：異名*G. intestinalis*または*G. duodenalis*）は別名ランブル鞭毛虫とも呼ばれる鞭毛虫類に属する原虫で、感染源は「シスト」と呼ばれる形態のものになります。いずれの原虫も、ヒトや動物（ウシ、ブタ、ネコ、イヌなど）の消化管に寄生することにより増殖し、激しい下痢症状を呈した感染症を引き起こします。オーシストおよびシスト（オーシスト等と略する）は、感染力が強く少数でも感染が起こり、水中では数ヵ月程度は感染力を失いません。また、小型であるため浄水処理による完全除去が難しく、塩素消毒にも強い抵抗性を示します。

従来オーシスト等の検出には顕微鏡検査法が用いられていましたが、平成24年3月には、最新の情報や蓄積された研究成果に基づき厚生労働省健康局水道課長通知「水道における指標菌及びクリプトスポリジウム等の検査方法について」（平成19年3月30日健水発第033006号、平成24年3月2日健水発第0302第2～4号改訂）（以下通知法と記載する）が発出され、顕微鏡検査法に加えて遺伝子検査法が収載され、遺伝子検査法のひとつとして「リアルタイムPCR法」が収載されました。

リアルタイムPCR法は、蛍光物質を使用してPCR増幅産物をリアルタイムでモニターし解析する方法で、簡便性、反応開始から数時間で結果判定ができる迅速性、検査で重要視される反応特異性の高さから、近年、環境衛生管理において急速に普及している手法です。

本冊子では、Thermal Cycler Dice® Real Time System *II* とCycleave®RT-PCR *Cryptosporidium* (18S rRNA) Detection KitまたはCycleave®RT-PCR *Giardia* (18S rRNA) Detection Kitを用いたクリプトスポリジウム、ジアルジアの検出についてご紹介します。

目　次

Ⅰ．クリプトスポリジウム、ジアルジア検出の概要 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・3
1）通知法におけるクリプトスポリジウム、ジアルジア検査
2）遺伝子検査について
Ⅱ．遺伝子検査の準備と注意事項・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・5
1）必要な実験器具・装置
2）実験室や設備について
Ⅲ．実験操作について ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・10
1）キットについて
2）検水の濃縮
3）オーシスト等の分離・精製
4）ビーズ/ オーシスト等複合体からオーシスト等の解離
5）核酸抽出
6）逆転写反応
7）リアルタイムPCR
8）解析　（データ解析の一例）
Ⅳ．付録　遺伝子検査の原理 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・24
Ⅴ．関連製品一覧 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・30

Ⅰ．クリプトスポリジウム、ジアルジア検出の概要

1） 通知法におけるクリプトスポリジウム、ジアルジア検査

従来、オーシスト等の検出には顕微鏡検査法が用いられていましたが、新たに遺伝子検査法が追加されました。

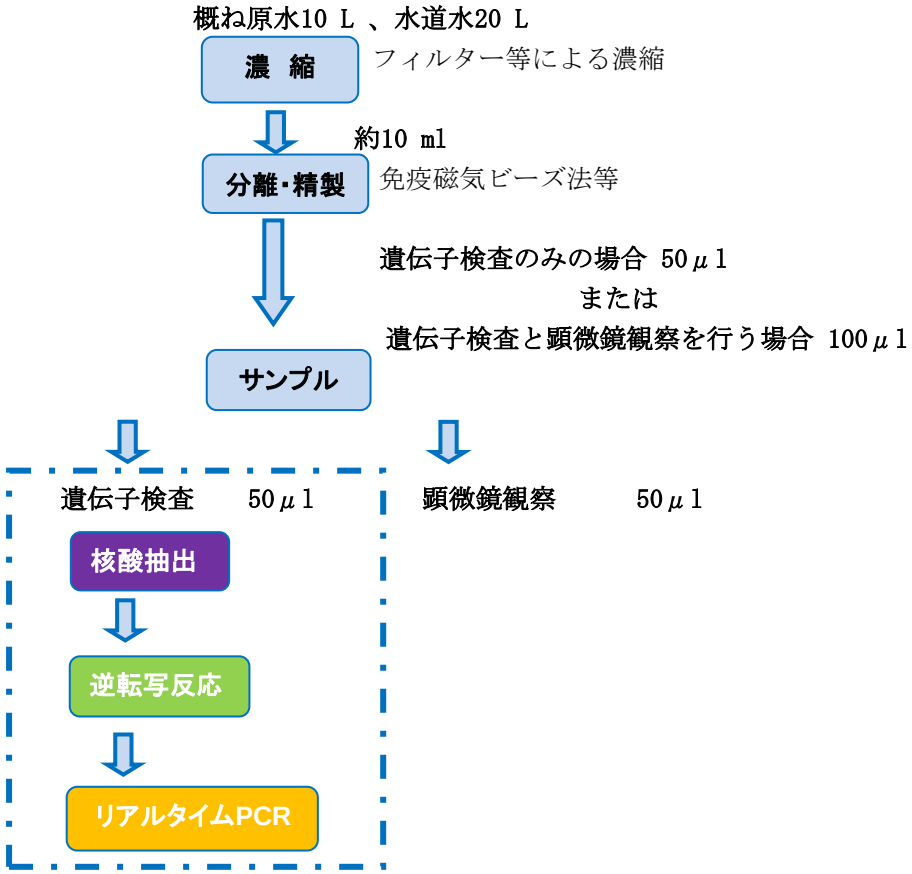
厚生労働省健康局水道課長通知 「水道における指標菌及びクリプトスポリジウム等の検査方法について」 （平成19年3月30日健水発第033006号、平成24年3月2日健水発第0302第2～4号改訂）（以降［通知法］と略する）において、クリプトスポリジウム、ジアルジア検査について記載されている内容をご紹介いたします。

検査法

顕微鏡法のみ	平成19年3月30日健水発第033006号
顕微鏡法と遺伝子検査	平成24年3月2日健水発第0302 第2～ 4号改訂

顕微鏡法は形態観察や、抗体反応により蛍光を発する粒子の寸法、外部・内部形態に基づいてオーシスト等を検出します。一方、遺伝子検査はクリプトスポリジウムまたはジアルジアに特異的な遺伝子を検出する方法です。

検査の流れ



2) 遺伝子検査について

① 通知法では、遺伝子検査について以下のように記載されています。

- リアルタイムPCR法あるいはLAMP法等がある。
- 特異性の検証を経た上で使用すること。
- 試料水中の1個のオーシスト等を検出する感度が必要。
- rRNAやrDNA等の多コピーの遺伝子を標的とし、rRNAはその逆転写産物を標的とする逆転写PCR法や逆転写LAMP法が用いられる。
- オーシスト等の定量 ［付録４］
  オーシスト等の濃度既知の比較的新鮮な原液試料と濃度未知試料を同一の方法で核酸抽出と遺伝子増幅反応を行い、Ct値（定量PCRの蛍光による遺伝子検出に要するサイクル数）を測定する。オーシスト等の数とCt値の関係から検量線を作成する。この検量線を用いて、未知試料のCt値からオーシスト等の数を算出する。

②遺伝子検査用キットについて

〈 該当製品 〉

Cycleave®RT-PCR *Cryptosporidium* (18S rRNA) Detection Kit	製品コードCY230
Cycleave®RT-PCR *Giardia* (18S rRNA) Detection Kit	製品コードCY231

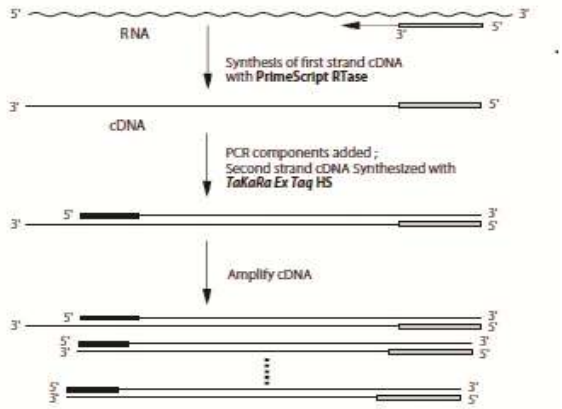
これらの製品では、クリプトスポリジウム属18S rRNA遺伝子またはジアルジア18S rRNA遺伝子をターゲットとしています。ゲノムDNA上の遺伝子に加え、クリプトスポリジウム由来RNAまたはジアルジア由来RNAを逆転写したcDNAも検出するキットです。

ゲノムDNAに対しRNAはコピー数が多いことが知られており、RNAを対象としたリアルタイムPCR法（リアルタイムRT-PCR法）により、微量のクリプトスポリジウムまたはジアルジアを検出することが可能です。

③特異性や検出感度の検証結果については、「平成23年度厚生労働科学研究 （健康安全・危機管理対策総合研究事業）「水道における水質リスク評価および管理に関する総合研究（微生物分科会）」クリプトスポリジウム等検査における遺伝子検査法の定量に関する検討」をご参照ください。

<u>リアルタイムRT-PCRの原理</u>

逆転写酵素であるPrimeScript RTaseによりRNAからcDNA合成を行い、その反応液の一部を鋳型として *TaKaRa Ex Taq* HS によるリアルタイムPCR増幅を行います。



II．遺伝子検査の準備と注意事項

リアルタイムPCRはわずか1分子の鋳型の検出も可能であるため、反応液調製時に鋳型となりうる核酸等が混入しないように細心の注意が必要です。

1）必要な実験器具・装置

Cycleave®RT-PCR *Cryptosporidium* (18S rRNA) Detection KitまたはCycleave®RT-PCR *Giardia* (18S rRNA) Detection KitとThermal Cycler Dice® Real Time System*II* 等を用いてオーシスト等を検出する際に必要な器具類について、ご紹介します。

「核酸の抽出」、「反応液の調製」、「鋳型の添加」に共通で必要となる器具については、共用とせずにそれぞれの使用用途に分けてご用意ください。

A. 核酸の抽出に必要な器具

器具名称		用途など	
①	超低温フリーザーまたは液体窒素やドライアイス／アセトン混合物	オーシスト等からの核酸抽出に使用します。 ドライアイス直付けによる冷凍も可能です。	
②	超音波洗浄機	メガネ洗浄用で代用が可能です。	
③	ヒートブロック	凍結融解(37℃)、酵素処理(60℃、75℃)、酵素の失活(95℃)に使用します。	

B. 逆転写反応およびリアルタイムPCRに必要な器具

器具名称		用途、注意事項など	
①	PCR装置	逆転写反応に使用します。 ③リアルタイムPCR装置で代用が可能です。	

②	0.2 ml　チューブ	DNase、RNaseフリーの製品または、オートクレーブ滅菌したチューブを使用ください。	
③	リアルタイムPCR用装置	PCR増幅をリアルタイムでモニタリングできます。Thermal Cycler Dice® Real Time System *II* なら96サンプルを一度に処理できるため、検量線作成時にも多検体での解析が可能です。 Thermal Cycler Dice® Real Time System *Lite* はエコノミータイプのリアルタイムPCR装置で、48サンプルを一度に処理できます。	 Thermal Cycler Dice® Real Time System *II* （製品コードTP900） Thermal Cycler Dice® Real Time System *Lite* （製品コードTP700）
④	リアルタイム専用 0.2 mlチューブ	独立型フラットキャップ付き8連チューブをお勧めします。ひとつひとつふたの開閉ができ、コンタミネーション回避に役立ちます。切り離せばシングルチューブとしても利用できます。	 0.2 ml 8-strip tube, individual Flat Caps （製品コードNJ600）
⑤	パーソナル卓上微量遠心機　（8連用）	0.2 mlチューブやリアルタイム専用の8連チューブをスピンダウンする際に使用します。	
⑥	アルミラック （1.5 ml用、0.2 ml用）	1.5 mlと0.2 mlのPCRチューブに対応したものがあると、便利です。 氷上にセットして冷却しながら反応液を調製できる金属タイプがお勧めです。	

⑦	アイスボックス	発泡スチロール製などのアイスボックスにクラッシュアイスを入れて使用します。 反応液調製時に試薬や反応液のチューブを立てて冷却し、試薬の劣化を防ぎます。	
⑧	クリーンベンチ	クリーンな環境を作り、試薬調製に使用します。 試薬調製用と核酸添加用をご用意いただくことをお勧めします。	

C. その他、エリアごとに必要な器具

器具名称		用途	
①	マイクロピペット	核酸調製専用とPCR反応試薬調製専用に各1本を2セットと ～10μl用（～20μl用） ～200μl用、～1000μl用10μl 核酸添加専用として10μl用を1本ご用意ください。 各実験エリアからの持ち出しおよび兼用はコンタミネーションの防止のため、行わないでください。	
②	マイクロピペット用チップ	エアロゾルによるコンタミネーションを防止するために疎水性フィルター付きを、各メーカーのマイクロピペットに対応した滅菌済のものを使用ください。	
③	1.5 mlチューブ	オートクレーブ滅菌したチューブを、各エリアで用意して使用ください。	

④	パーソナル卓上微量遠心機　（1.5 ml用）	反応液をチューブに分注後、チューブ壁などに飛散した反応液をスピンダウンするときに使用します。	
⑤	ディスポーザブルグローブ	手袋を着用することで、手の汚れや汗などによるコンタミネーションを防止します。（パウダーフリータイプ）	
⑥	白衣、スリッパ、マスク	実験エリアごとに専用のものを用意することで、コンタミネーション防止に役立ちます。	

２）実験室や設備について

リアルタイムPCRは非常に感度の高い反応です。コンタミネーションを防止するために、反応液の調製から検出まで次の3つのエリアを設定し、物理的に隔離することを**推奨します。**

●エリア1：反応試薬のみを扱うエリア

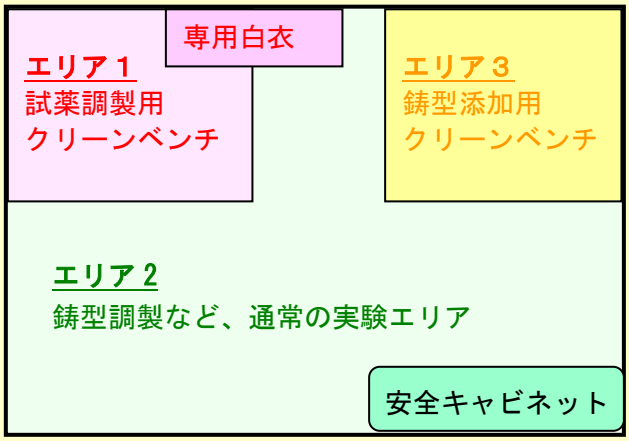
逆転写試薬およびリアルタイムPCR反応液の調製、分注を行う。
（鋳型となる核酸は一切持ち込まない）

●エリア2：検体を調製するエリア

検体のろ過、核酸調製を行う。
安全キャビネット設置が理想。

●エリア3：調製済の鋳型を扱うエリア

分注済の反応液への鋳型の添加と標準サンプルの希釈を行う。



1～3のエリアは、部屋ごとの区分けや、クリーンベンチによる隔離をしてください。
各エリアで使用するマイクロピペットやチップ、白衣や手袋は、エリア専用とし、共通での使用を避けてください。特にエリア1には、鋳型となるDNAが存在することのないよう、細心の注意を払って下さい。

← 左図の写真のように、クリーンベンチ内にピペットやチップを常設し、使用しないときはUV照射しておくのが便利です。

コンタミネーションが発生すると、実験結果に影響を及ぼしますので、事前に可能な範囲で実験環境の整備を整えておくことをお勧めします。
万が一、コンタミネーションが発生した場合は、考えられる原因をひとつひとつ対処してください。試薬へのコンタミネーションが疑われるときは、新しいものに取り替える必要があります。実験台や器具類は十分洗浄をして滅菌を徹底するようにしてください。

コンタミ防止のために

- 実験に使用する器具類
  エリア間での共用は避ける。
  マイクロピペットやチップはもちろん、白衣や履物もエリアごとに準備。
  実験ノートやペン、はさみも、汚染の原因とならないよう留意して使用してください。

- 実験環境
  核酸（特に RNA）の調製にあたっては、実験者の汗や唾液に含まれる RNase の混入を防ぐため作業中は清潔なマスクおよびディスポーザブルグローブを着用し RNA 調製専用の実験台を設けるなどの細心の注意を払ってください。
  実験器具に関しては、可能な限りディスポーザブルのプラスチック製品を使用するようにし、実験台、実験器具などの RNase 除去には RNase-OFF（製品コード 9037）の使用をお勧めします。
  また、RNA 実験に用いる器具（プラスチックおよびガラス）は、他の器具と区別して RNA 専用としてください。DNA除去には、DNA-OFF™（DNA コンタミネーション除去溶液）（製品コード 9036）による拭き取りや、2.5%次亜塩酸ナトリウムの使用、UV 照射、乾熱滅菌（180℃、2 時間）が効果的です。

III．実験操作について

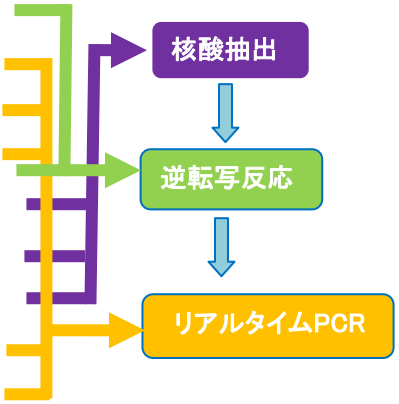
1）キットについて

キットには、核酸抽出からRT-PCR検出までの試薬コンポーネントが含まれています。

Cycleave®RT-PCR *Cryptosporidium* (18S rRNA) Detection Kit ［ 製品コードCY230 ］

キットの内容　(25μl 反応、50回分)

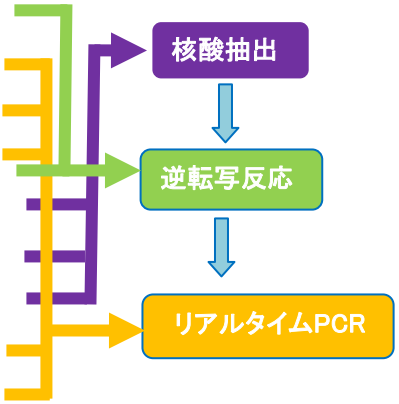
1.	5 × PrimeScript RT Master Mix	100μl
2.	2 × Cycleave Reaction Mixture	625μl
3.	*Crypto.* Primer/Probe Mix (FAM、ROX)	250μl
4.	RNase Free dH_2O	1 ml
5.	Lysis Buffer	625μl × 4本
6.	Proteinase K	50μl
7.	dH_2O (for Dilution)	150μl
8.	*Crypto.* Positive Control	50μl
9.	EASY Dilution (for Real Time PCR)	1 ml × 2本



Cycleave®RT-PCR *Giardia* (18S rRNA) Detection Kit　［ 製品コードCY231 ］

キットの内容　(25μl 反応、50回分)

1.	5 × PrimeScript RT Master Mix	100μl
2.	2 × Cycleave Reaction Mixture (*Giardia*)	625μl
3.	*Giardia* Primer/Probe Mix (FAM、ROX)	250μl
4.	RNase Free dH_2O	1 ml
5.	Lysis Buffer	625μl × 4本
6.	Proteinase K	50μl
7.	dH_2O (for Dilution)	150μl
8.	*Giardia* Positive Control	50μl
9.	EASY Dilution (for Real Time PCR)	1 ml× 2本



「サンプルの濃縮から分離・精製」までは、顕微鏡観察と遺伝子検査法で同じ調製方法となります。
これらの操作に使用する試薬類は、上記キットに含まれませんので、別途ご用意ください。

2）検水の濃縮

オーシスト等は感染力が強く、水道では低濃度でも問題になるため、原水、水道水ともに大量の水を採取して試験を行います。また、ガラス壁に付着しやすい性質があるといわれていることから、採取容器は大型のポリエチレン又はポリプロピレン製容器を用いる必要があります。

通知法に記載されている水の濃縮方法には、メンブレンフィルター吸引ろ過－アセトン溶解法、親水性PTFEメンブレンフィルター法、カートリッジフィルター法等があります。
操作の詳細は「日本水道協会発行　クリプトスポリジウム－解説と試験方法－」をご参照ください。

3）オーシスト等の分離・精製

免疫磁気ビーズ法では、Dynabeads GC-combo（ベリタス社）などを利用してビーズ／オーシストまたはビーズ／シスト複合体を調製し、オーシスト等の分離・精製を行う。

オーシスト等の分離・精製は、遺伝子検査と顕微鏡検査で共通の工程ですが、リアルタイムPCRの反応結果に影響を与える可能性がありますので、一般的な注意事項とともに簡単な操作説明をします。

逆転写反応およびリアルタイムPCRを阻害する可能性がある夾雑物は、本工程により完全に除去することが重要です。

試薬キットの取扱説明書の用法や使用上の注意に従って操作をしてください。
Dynabeads GC-combo（ベリタス社）を用いた場合の簡単な説明を記載しています。操作の詳細は「日本水道協会発行　クリプトスポリジウム　－解説と試験方法－」をご参照ください。

用意する試薬

Dynabeads GC-combo

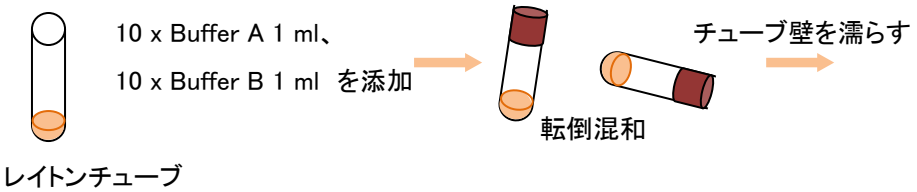
誘出液（1% PET溶液）

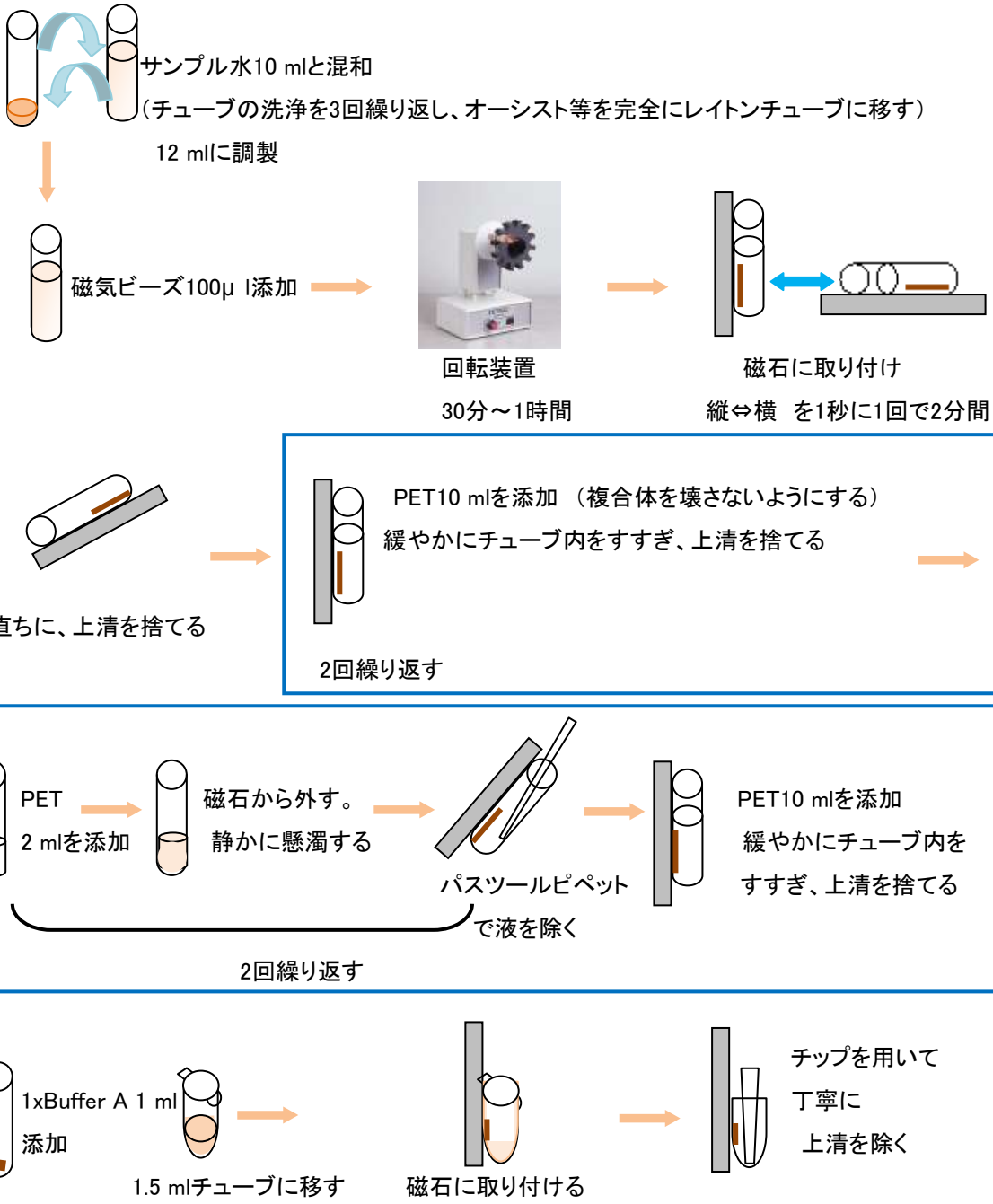
ピロリン酸ナトリウム・10水塩	20 g	800 mlの精製水に溶解し、1N 塩酸または
$EDTA_3Na$	30 g	1N 水酸化ナトリウムを用いてpH7.4に
Tween80	10 g	調製した後、精製水で1 Lにメスアップする。
		100倍に希釈して使用する。

用意する器具

パスツールピペット、レイトンチューブ、回転ミキサー、磁気ビーズ用磁石、試験管立て

操作





＊　青枠内の洗浄操作にて、細かな粒子すべてを取り除くことにより、PCR反応の阻害を防ぐことができます

操作上の注意　　通知法より引用

(1) 操作法等については試薬キットの用法や使用上の注意に従う。

(2) 試料中の懸濁粒子が多い試料ではオーシスト等の回収率が低下する傾向が認められるので、濃縮物と免疫磁性体粒子との適正な混合比を検討しておく必要がある。

(3) 濃縮物と免疫磁性体粒子を混合する場合、オーシスト等と免疫磁性体粒子を効率的に接触･反応させるための工夫が必要である。特に、試料水中の懸濁物質の捕捉･濃縮過程で形成された濃

縮物の塊を十分にほぐして、オーシスト等が良好な分散状態にあるようにしなければならない。また、免疫磁性体粒子と懸濁物質とを均一に混和させるように注意する必要がある。

(4) 免疫磁性体粒子とオーシスト等の結合力は比較的弱いので、反応後は強い振とうや衝撃を避ける。

(5) 免疫磁性体粒子とオーシスト等の反応時間は室温で30分間ないし１時間が一般的だが、低温下で一晩の反応でも良好な結果が得られる。あるいは、試薬キットに特別な指示があれば、その指示に従う。

(6) 遺伝子検出法用の試料を調製する場合は、遺伝子増幅反応への阻害物質の混入を極力防ぐため、夾雑物が完全に除去されるまで免疫磁性体粒子 - オーシスト等の結合物を繰り返し洗浄する。

(7) その他、微量の試料を散逸させないよう、丁寧に取り扱う必要がある。

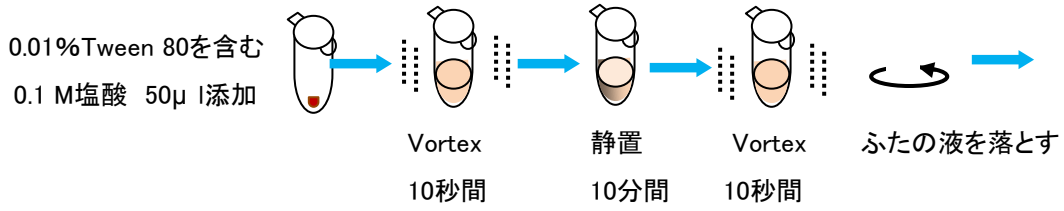
４）ビーズ/ オーシスト等複合体からオーシスト等の解離

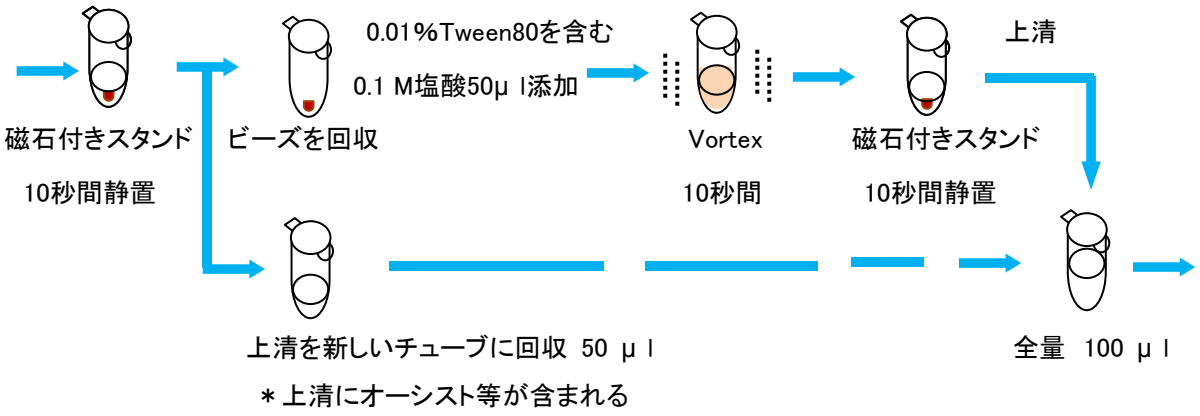
用意する試薬

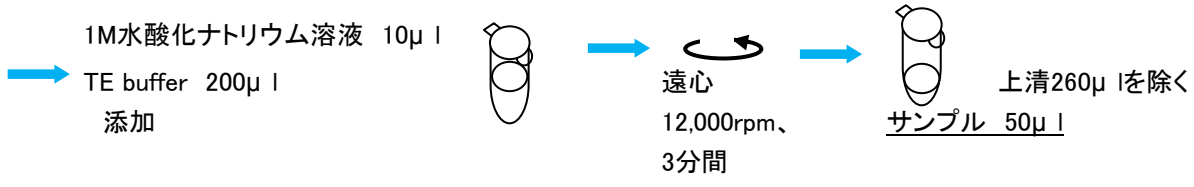
0.01%Tween 80を含む0.1 M塩酸
1M水酸化ナトリウム溶液
TE buffer (10 mM Tris-HCl, pH7.6、1 mM EDTA)

操作

ビーズ／オーシスト等複合体







TE: 10 mM Tris-HCl, pH7.6、1 mM EDTA

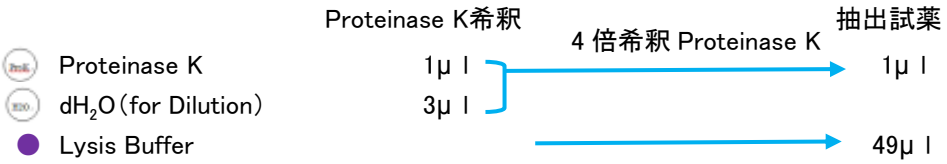
直ちに反応しない場合は冷凍保存（－20℃以下）

５）核酸の抽出　　～エリア２で実施～

核酸は細胞膜や核膜を、界面活性剤などを用いて破砕することにより遊離しますが、オーシスト等は非常に固い殻に覆われているため、凍結融解およびProteinase Kによる酵素反応を併用することで、核酸を遊離します。

試薬の調製

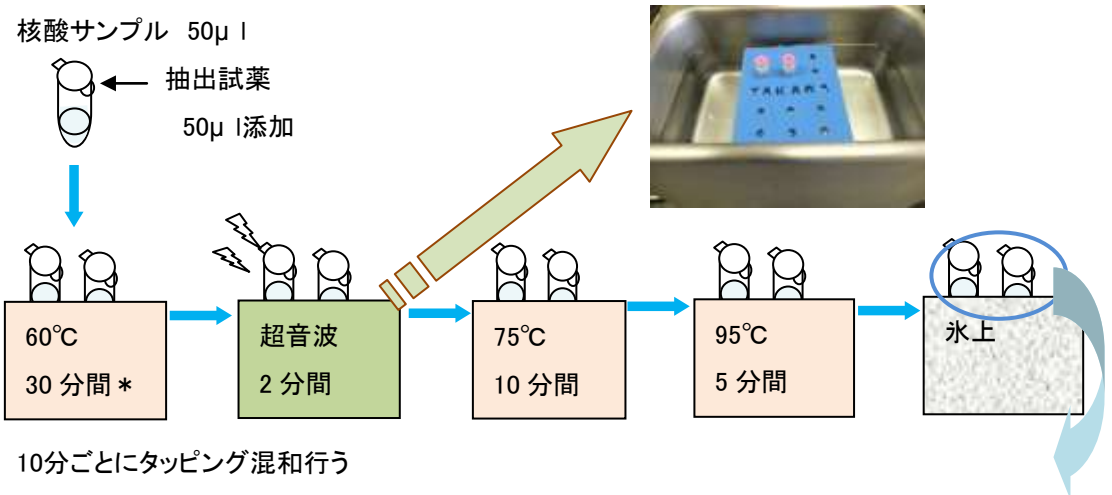
- 手袋を着用する。
- サンプル数に応じて必要本数分をまとめて、用時調製する。



操作

－80℃（ディープフリーザーまたはドライアイスを利用）
と37℃の凍結融解操作を5回繰り返す。

＊　完全に凍っていることを確認してから溶解を行う



＊　10分ごとにタッピング混和行う

鋳型溶液として用いる。
直ちに反応しない場合は、冷凍で保存

６）逆転写反応

DNAより存在量の多いRNAを標的遺伝子としますが、RNAはPCR法の直接の鋳型とはなりません。そこで、RNAを鋳型に逆転写反応を行い、得られたcDNAを鋳型にしてPCR法を行います。

［ 試薬の調製 ］　～エリア１で実施～

- 手袋を着用し、試薬は泡立てないように溶解後氷上におく
- キットに添付のPositive Controlは、逆転写反応を行う必要はありません。

鋳型以外のマスターミックスを「必要本数+α」調製し、泡立てないように混和し、卓上遠心機でチューブのふたについた液を落とす。

●	5 × PrimeScript RT Master Mix	2μl
○	RNase Free dH2O	6μl
	鋳型溶液	2μl　＊
	全量	10μl

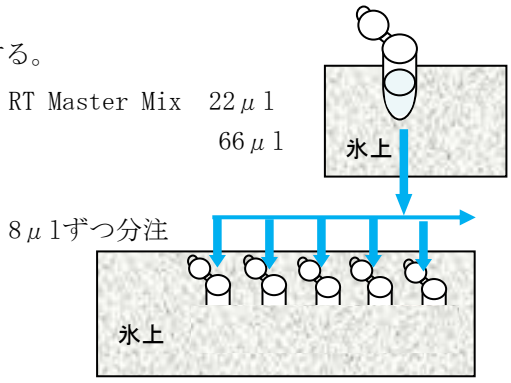
＊　定性反応では鋳型溶液の添加量は、1～ 5μlまで変更が可能です。
最終反応液量が10 μlとなるようにRNase Free dH2Oの量を調節してください。

検体の水質によって、または鋳型溶液の純度が低い場合などには、反応阻害を起こす可能性があります。そのような場合は、添加する鋳型溶液の量を減らしてください。または、さらに鋳型溶液の精製を行ってください。

例えば10反応を行う場合

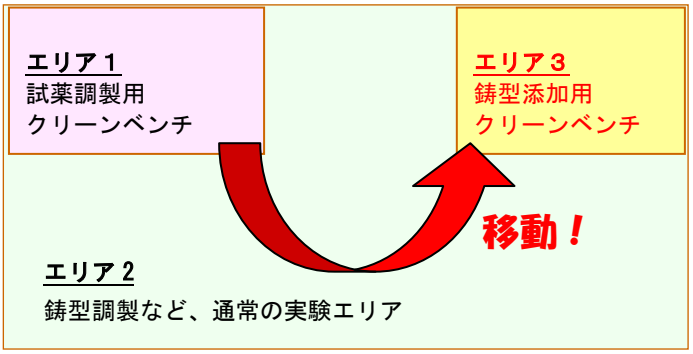
11反応分の試薬を調製する。

●	5 × PrimeScript RT Master Mix	22μl
○	RNase Free dH2O	66μl



チューブのふたを軽く閉め

エリア3へ移動



［ 鋳型の添加 ］　　～エリア3で実施～

添加するチューブのふたを開け、鋳型溶液を2μl添加する。

［ 反応 ］　　～エリア3で実施～

サーマルサイクラーを利用し以下の反応を行う。　設定方法は機器の説明書に従ってください。

37℃　15分　（逆転写反応）
85℃　 5秒　（逆転写酵素を熱失活させる）
4℃
反応終了後の逆転写反応液は、冷凍（－20℃）で保存が可能

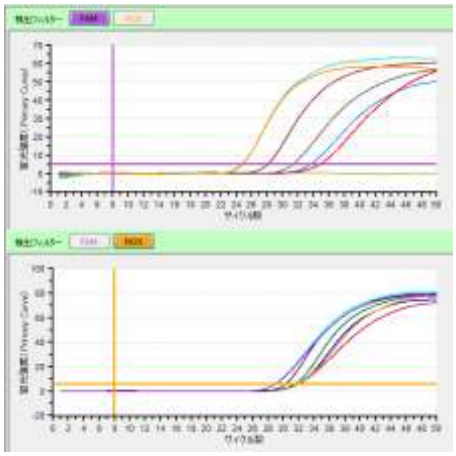
７）リアルタイムPCR

合成したcDNAを鋳型に、クリプトスポリジウムまたはジアルジアに特異的な18S rRNA配列を含む領域を増幅し、増幅が起こるか否かでオーシスト等の有無を確認します。

1本のチューブでターゲットとインターナルコントロールを2波長で同時検出するマルチプレックスPCRを行います。そのため、サンプルごとに反応が正しく行われているかを確認することが可能です。

FAM 検出
ターゲット（オーシスト等）

ROX 検出
インターナルコントロール*
（偽陰性をモニター）



＊インターナルコントロール

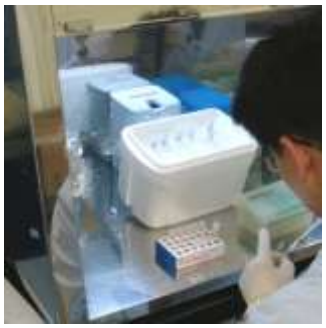
PCR反応の可否判定を目的とした、ターゲットとは無関係な配列を有するDNA分子です。ターゲット遺伝子が検出されない場合でも、インターナルコントロールDNAの検出ができていれば、PCR反応に阻害等の問題がないことが判断でき、ターゲット遺伝子は検出限界以下と判定できます。

［ 反応液の調製 ］　～エリア１で実施～

● 手袋を着用し、試薬は泡立てないように溶解後氷上におく

鋳型以外のマスターミックスを「必要本数+α」調製し、泡立てないように混和し、卓上遠心機でチューブのふたについた液を落とす。

＊　サンプルの反応以外に、Positive Control反応およびNegative Control反応も必ず行う。



クリプトスポリジウムを検出する場合

● 2 × Cycleave Reaction Mixture*	12.5μl
● *Crypto.* Primer/Probe Mix (FAM、ROX) *	5.0μl
○ RNase Free dH_2O	5.5μl
逆転写反応液 または Positive Control	2.0μl
または RNase Free dH_2O	
全量	25.0μl

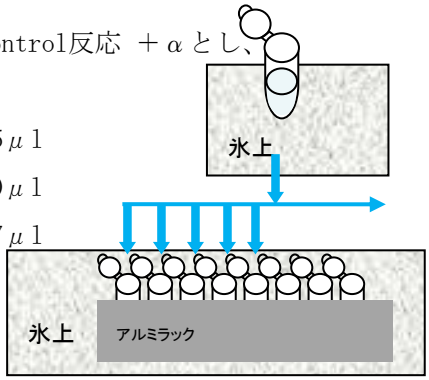
＊　ジアルジアを検出する場合は、2 × Cycleave Reaction Mixture (*Giardia*) ならびに *Giardia* Primer/Probe Mix (FAM、ROX) を使用する。

例えばサンプル10反応を行う場合

10反応 ＋ Positive Control反応 + Negative Control反応 ＋αとし、
14反応分の試薬を調製する。

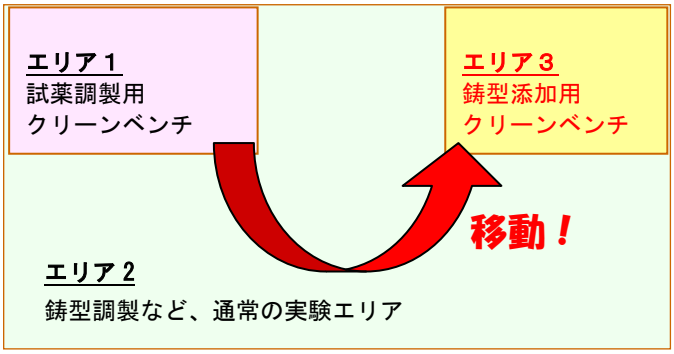
● 2 × Cycleave Reaction Mixture*	175μl
● *Crypto.* Primer/Probe Mix (FAM、ROX) *	70μl
○ RNase Free dH_2O	77μl

23 μlずつ分注



Negative Control反応に RNase Free dH_2O　2 μlを添加し、しっかりとふたを閉める。
他のチューブのふたは、軽く閉める。

エリア3へ移動

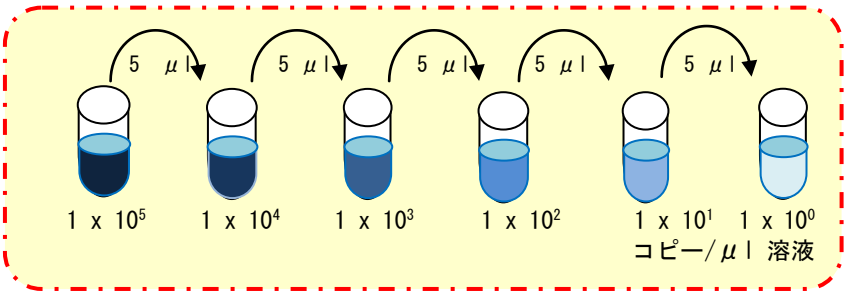


[検量線作成用標準サンプルの調製]　　～エリア3で実施～

定量解析を行う場合は、標準サンプルの希釈調製を行います。定性解析の場合は不要です。
ここでは、Cycleave®RT-PCR *Cryptosporidium* (18S rRNA) Detection KitおよびCycleave®RT-PCR *Giardia* (18S rRNA) Detection KitのPositive Controlを使用する場合の調製法を紹介します。

キットに添付のPositive Control とEASY Dilutionを用いて、検量線作成用の標準サンプルの段階希釈液を調製する。
1反応にはそれぞれ2μlを使用。N=2以上での反応を推奨します。

1. 1 × 10^5 copies/μl　(Positive Control 原液)
2. 1 × 10^4 copies/μl　(Positive Control 原液 5μl＋ EASY Dilution 45μl)
3. 1 × 10^3 copies/μl　(2. の1× 10^4 copies/μl 溶液 5μl ＋ EASY Dilution 45μl)
4. 1×10^2 copies/μl　(3. の1×10^3 copies/μl溶液 5μl ＋ EASY Dilution 45μl)
5. 10 copies/μl　(4. の1×10^2 copies/μl 溶液 5μl ＋ EASY Dilution 45μl)
6. 1 copy/μl　(5. の10 copies/μl 溶液 5μl ＋ EASY Dilution 45μl)



[鋳型の添加]　　～エリア3で実施～

サンプルおよびPositive Controlを2 μl添加し、しっかりとふたを閉める。
反応チューブを軽く遠心後、Thermal Cycler Dice® Real Time System *II* にセットする。

機器操作の詳細は、取扱説明書を参照してください。

[反応]　　～エリア3で実施～

食品環境検査用ソフトウェアVer. 1.0を使用した場合の簡単な操作法を示します。詳細な設定方法は各製品の取扱説明書に従ってください。

解析タイプ

＝　定性反応　＝

Cycleave®RT-PCR *Cryptosporidium* (18S rRNA) Detection Kit　：　＋／－判定 (CycleavePCR Kit)

Cycleave®RT-PCR *Giardia* (18S rRNA) Detection Kit　：　＋／－判定

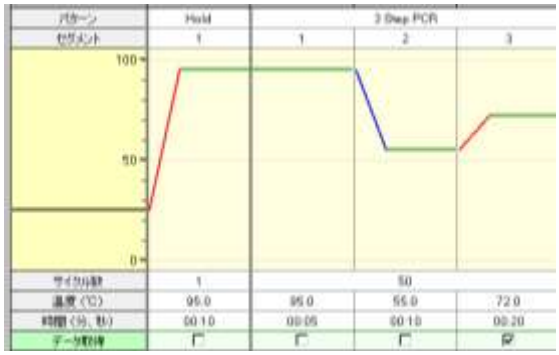
＝　定量反応　＝

Cycleave®RT-PCR *Cryptosporidium* (18S rRNA) Detection Kit　：　絶対定量　多波長検出

Cycleave®RT-PCR *Giardia* (18S rRNA) Detection Kit　：　絶対定量　多波長検出

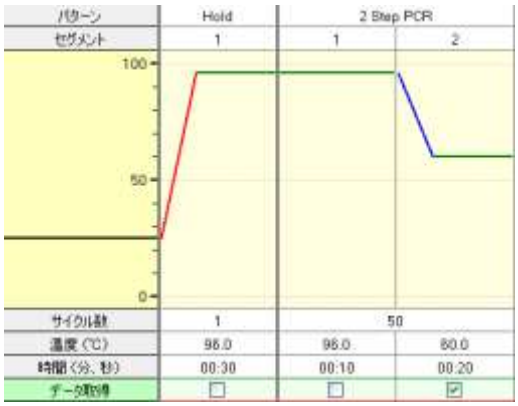
PCR条件

Cycleave®RT-PCR *Cryptosporidium* (18S rRNA) Detection Kit



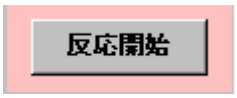
95℃ 10 秒
↓
95℃ 5 秒
55℃ 10 秒　50 サイクル
72℃ 20 秒

Cycleave®RT-PCR *Giardia* (18S rRNA) Detection Kit



96℃ 30 秒
↓
96℃ 10 秒
60℃ 20 秒　50 サイクル

反応開始ボタンを押して、反応スタート



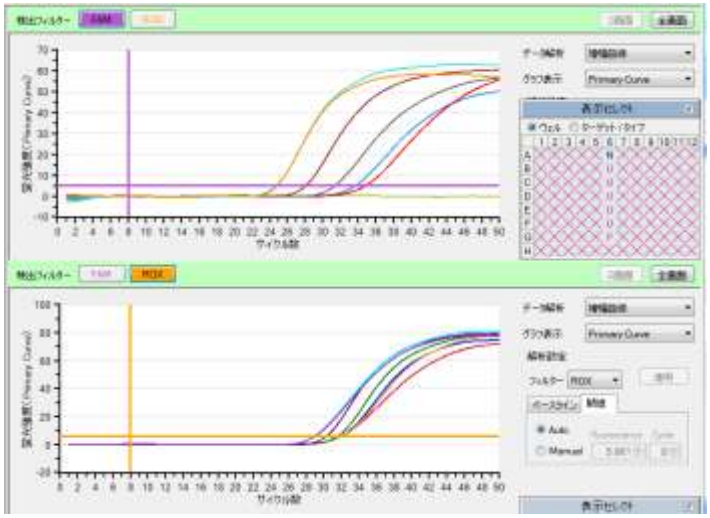
８）解析　（データ解析の一例）

定性解析では、qPCR反応液中にオーシスト等の核酸断片が含まれているか否かを確認します。
定量解析では、キットに添付のPositive Controlを用いた検量線を作成し、この検量線を用いてサンプルに含まれるオーシスト等の数をPositive Control相当量(コピー数)として解析する解析方法を示します。

[定性解析]

オーシスト等を検出するFAM検出でCt値が得られた場合をプラス、Ct値が得られなかった場合をマイナスと判定します。
インターナルコントロールを検出するROX検出では、Negative Controlを含めCt値が得られます。ROX検出でCt値が得られなかった場合は、何らかの要因で偽陰性となっていると推測されます。ただし、オーシスト等が非常に多く含まれFAM検出のCt値が小さい場合（増幅曲線が早くたちあがった場合）には、ROX検出でCt値が得られない場合がありますが、この場合は正しく反応が進んでおり、ターゲットの検出はプラスと判定します。

増幅曲線



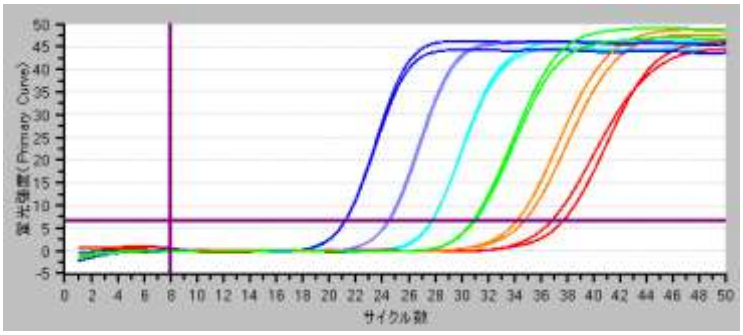
判定結果

必ず、Negative ControlおよびPositive Controlは、以下の判定であることを確認する。

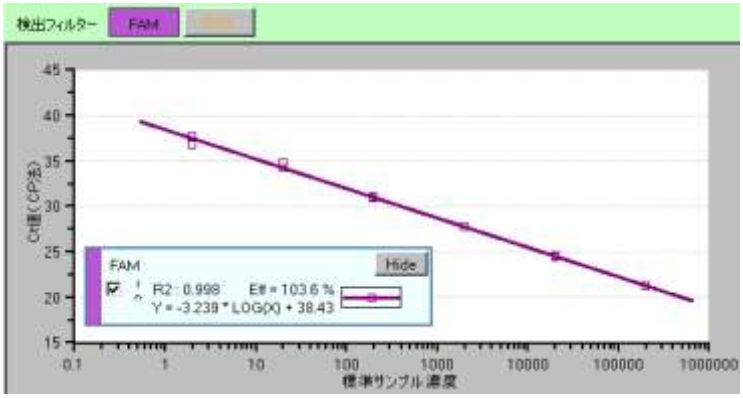
	FAM検出	ROX検出	判定結果
Negative Control	：Ct値が得られない	Ct値が得られる	OK
Positive Control	：Ct値が得られる	Ct値が得られる	OK

［ 定量解析 ］

Positive Controlを10倍段階希釈した標準サンプルの反応では、以下の図のように濃度の濃いサンプルから順に蛍光シグナルが増加して増幅曲線が立ち上がります。



標準サンプルの反応の結果から、算出されたCt値と初期鋳型量より以下のような検量線が解析ソフトにより自動的に作成されます。



濃度未知サンプルは、解析ソフトにより同時に測定した標準サンプルの検量線を用いて、サンプルのCt値から定量値（Plasmidに換算したコピー数）を自動計算により算出、表示します。

検出フィルター FAM ROX

サンプルタイプ	レプリケート名	Ct値(CP)	平均Ct値(CP)	標準サンプル濃度	定量値(CP)	定量平均値(CP)
NTC	NC	–	–	–	–	–
NTC	NC	–	–	–	–	–
UNKN	Sample1	38.51	38.61	–	1.692E+000	1.586E+000
UNKN	Sample1	38.71	38.61	–	1.481E+000	1.586E+000
UNKN	Sample2	27.13	27.19	–	3.291E+003	3.165E+003
UNKN	Sample2	27.25	27.19	–	3.038E+003	3.165E+003
STD		41.35	38.62	2.000E+000	2.556E-001	2.806E+000
STD		37.69	38.62	2.000E+000	2.920E+000	2.806E+000
STD		34.76	34.48	2.000E+001	2.052E+001	2.525E+001
STD		34.19	34.48	2.000E+001	2.998E+001	2.525E+001
STD		30.87	30.94	2.000E+002	2.732E+002	2.618E+002
STD		31.00	30.94	2.000E+002	2.505E+002	2.618E+002
STD		27.75	27.77	2.000E+003	2.178E+003	2.157E+003
STD		27.78	27.77	2.000E+003	2.135E+003	2.157E+003
STD		24.45	24.50	2.000E+004	1.958E+004	1.901E+004
STD		24.54	24.50	2.000E+004	1.845E+004	1.901E+004
STD		21.21	21.21	2.000E+005	1.692E+005	1.697E+005
STD		21.20	21.21	2.000E+005	1.703E+005	1.697E+005

サンプルの Ct 値

標準サンプルの検量線を用いて算出されたサンプルの定量値

青枠： Positive Controlを用いた検量線の結果　　赤枠： サンプルの測定結果

解析例は、Sample 1は1.58コピー、Sample 2は3165コピー（Positive Controlのコピー数）に換算できた。

Ct値の算出には、Crossing Point法と2nd Derivative Maximum法の２方法がありますが、クリプトスポリジウムならびにジアルジアではCrossing Point法（解析結果では（CP)と記載）を用います。

[注意]

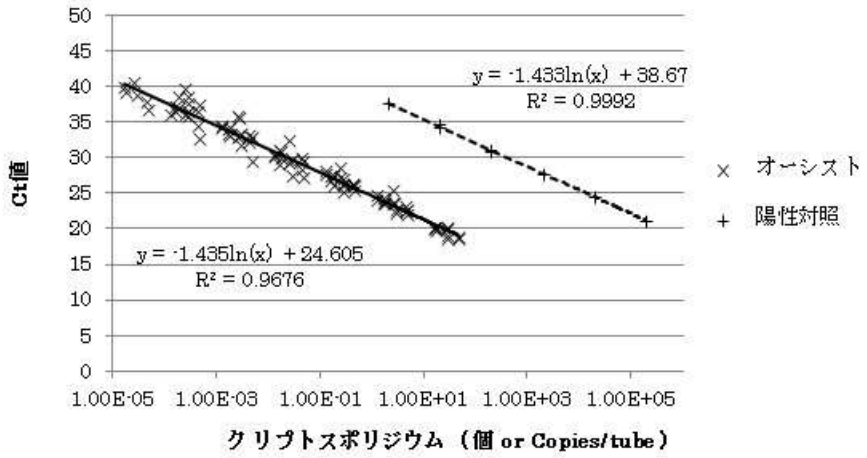
本キットは遺伝子検出キットであるため、死んだ原虫も検出されます。

また、サンプルの保存等の過程での劣化、サンプル中に含まれる阻害物質の量、逆転写反応効率などの影響より、原虫に含まれる実際のコピー数と算出されたPositive Controlの換算数が異なる場合があります。

＝　参考　＝

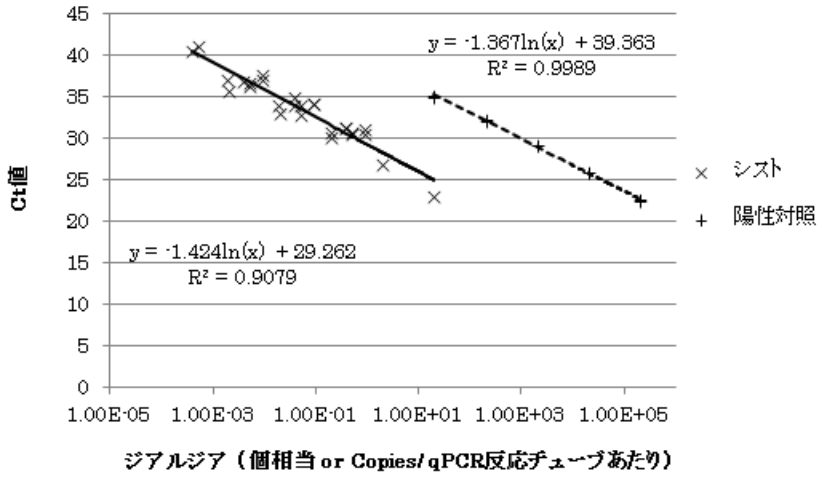
出典：

平成23年度厚生労働科学研究　（健康安全・危機管理対策総合研究事業）「水道における水質リスク評価および管理に関する総合研究（微生物分科会）」クリプトスポリジウム等検査における遺伝子検査法の定量に関する検討



※　上記出典において、「クリプトスポリジウム1オーシストあたりの18S rRNA量は、サイクリングプローブ法で18,000コピーに相当すると計算された。」と記載されています。

また、上記出典における図中の陽性対照および文中のPC は、Cycleave®RT-PCR *Cryptosporidium* (18S rRNA) Detection Kitに含まれる*Crypto.* Positive Controlです。



※ 上記出典において、「ジアルジア1シストあたりの18S rRNA量は、サイクリングプローブ法で1,600コピーに相当すると計算された。」と記載されています。

なお、上記出典における図中の陽性対照および文中のPCは、Cycleave®RT-PCR *Giardia* (18S rRNA) Detection Kitに含まれる*Giardia* Positive Controlです。

Ⅳ. 付録

遺伝子検査の原理

ー核酸抽出

核酸を細胞外に遊離することが、遺伝子検査の第一歩となります。
核酸は細胞膜や核膜を、界面活性剤などを用いて破砕することにより遊離します。

ー逆転写反応

DNAが主に核の中で情報の蓄積・保存を担うのに対して、RNAは必要な時にその情報の一時的な処理に合成・分解されるため細胞内の含有量は一定ではないもののDNAに比べると多く含まれています。そのため、RNAを標的遺伝子とする逆転写反応とPCRを組み合わせたRT-PCR法は、DNAを標的とした遺伝子検査法に比べ、高感度となります。
RNAはPCR法の直接の鋳型とはなりませんが、RNAを鋳型に相補的なDNAを生成させる逆転写反応（RTという）を行い、得られた逆転写反応物（cDNA）に対してPCR法を行うことができます。

ーPCR

［ PCR法の原理 ］

PCR（Polymerase Chain Reaction）法とは、

・DNA鎖の熱変性（denaturation step）
・プライマーのアニーリング（annealing step）
・ポリメラーゼによる相補鎖の合成（extension step）

を繰り返し行うことによりin vitroでDNAを増幅する方法である（図1参照）。この方法を用いると、DNAを数時間で少なくとも10^5倍に増幅できます。

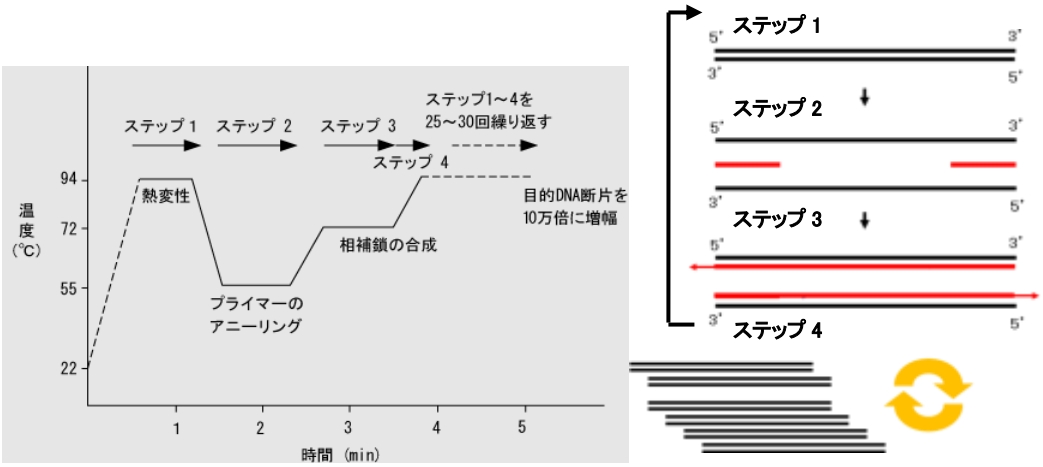


図1. PCRによるDNA増幅の工程

ステップ1：プライマー、dNTP、ポリメラーゼを含んだ反応液中で、目的とする二本鎖DNA断片（模式図　黒線）を熱変性する。（例えば、94℃、30 sec.）
ステップ2：熱変性により生じた一本鎖鋳型DNAにプライマー（模式図　赤線）をアニーリングする。（例えば、55℃、30 sec.）
ステップ3：DNAポリメラーゼを用いて相補鎖DNAを合成する。（例えば、72℃、1 min./kb）
ステップ4：増幅産物としての二本鎖DNAを再度熱変性して一本鎖にする。（ステップ1に戻る）

ステップ1～4を1サイクルとして、25～30サイクル繰り返す。ただし、目的DNA断片により、増幅の最大効率を得る条件が異なりますので、目的DNA断片に応じて設定条件を変更する必要があります。

ーリアルタイムPCR

PCR法には、従来から使用されているエンドポイントPCR法とリアルタイムPCR法があります。
リアルタイムPCR法とは、PCRの増幅量をリアルタイムでモニターし解析する方法であり、サーマルサイクラーと分光蛍光光度計を一体化したリアルタイムPCR専用の装置が必要です。
リアルタイムPCR法は、PCR反応後に電気泳動を用いて増幅産物の大きさを確認するエンドポイントPCR法に比べ、電気泳動の必要がない、反応後の解析はソフトウエア上で完結するため非常に簡便かつ迅速に結果が得られ、コンタミネーションのリスクが低い遺伝子検出方法です。
近年、従来のPCR法で行われていた遺伝子検査がリアルタイムPCRへ移行する例も多数あります。

[リアルタイムPCRの用途]

リアルタイムPCRは、遺伝子組換え食品の検査、ウイルスや病原菌の検出、検体中のウイルス量の解析などさまざまな用途に応用されています。

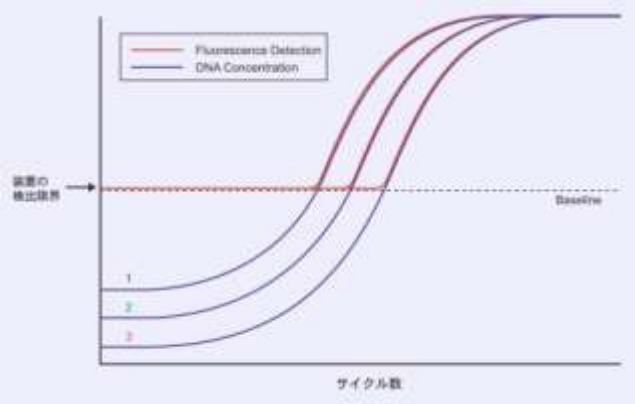
定性解析におけるリアルタイムPCRの利点
- 操作が簡便で迅速に結果が得られる
- 電気泳動が不要なので、コンタミネーションのリスクが低い

定量解析におけるリアルタイムPCRの利点
- 操作が簡便で迅速に結果が得られる
- 電気泳動が不要なので、コンタミネーションのリスクが低い
- 広いダイナミックレンジで正確な定量ができる

[　リアルタイムPCR装置による検出の原理]

リアルタイムPCRでは、PCR増幅産物をリアルタイムでモニタリングするため、指数関数的増幅域での正確な検出を行うことができます。これは、エンドポイントで解析する従来のPCR法などとは大きく異なる点です。

PCRでは、1サイクルごとにDNAが2倍、4倍、8倍、・・・・と指数関数的に増幅し、やがてプラトーに達します。この増幅の様子を、蛍光のシグナルとして、リアルタイムPCRでモニタリングし、得られた蛍光量をサイクルごとにプロットした曲線を増幅曲線と呼びます。
以下の図では、DNA濃度（実際の増幅産物量）を青線で示し、それを蛍光により検出したシグナル強度を赤線で示しています。PCR増幅産物量が装置の蛍光検出できる量に達すると、増幅曲線が立ち上がり始め、指数関数的にシグナルが上昇した後、プラトーに達します。



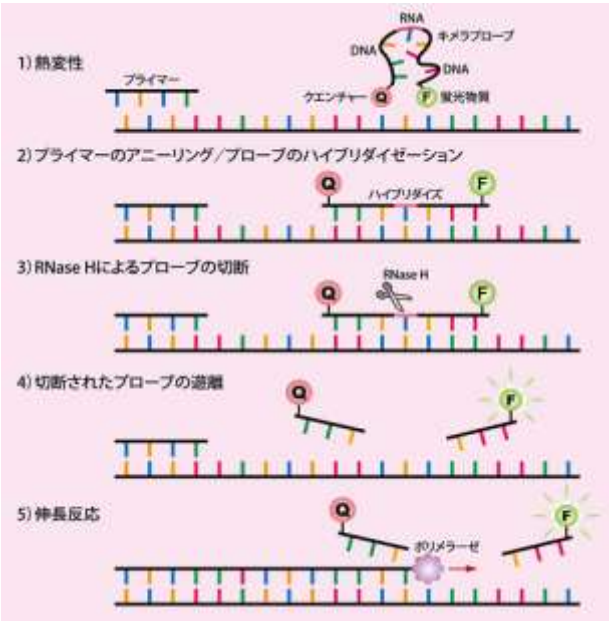
[蛍光検出法]

リアルタイムPCRでは、PCR増幅産物を蛍光のシグナルで検出します。蛍光検出法には、インターカレーターを用いる方法と蛍光標識プローブを用いる方法の2種類があります。

Cycleave®RT-PCR *Cryptosporidium* (18S rRNA) Detection KitおよびCycleave®RT-PCR *Giardia* (18S rRNA) Detection Kitで採用しているサイクリングプローブ法について説明します。

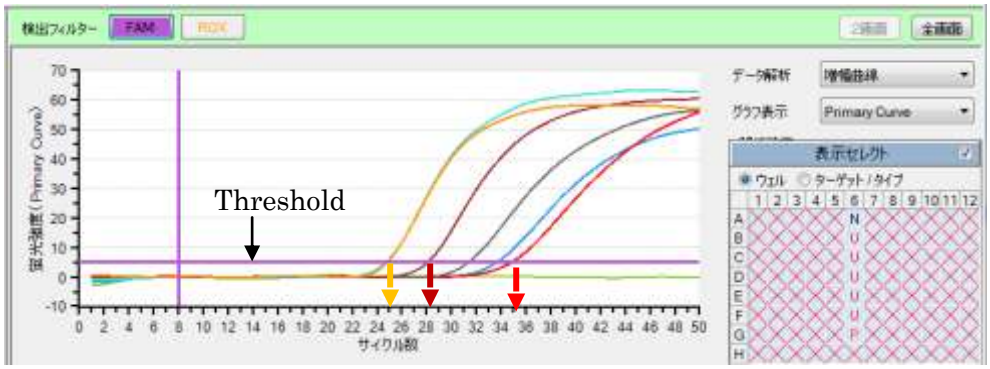
[サイクリングプローブ法]

サイクリングプローブは、RNAとDNAからなるキメラオリゴヌクレオチドで、片方の末端が蛍光物質で、もう一方の末端がクエンチャー物質で修飾されています。インタクトな状態では蛍光を発しませんが、PCR増幅産物とハイブリッドを形成すると、反応液中に含まれるRNase HによりRNA部分が切断されて蛍光を発します。サイクリングプローブのRNA付近にミスマッチが存在するとRNase Hによる切断は起こらないことから、非常に配列特異性の高い検出が可能です。



[定性解析について]

定性解析では、PCR増幅の有無で結果を判定します。
目的の遺伝子が増幅した場合、増幅曲線上に適当な閾値（Threshold）を設定し閾値と増幅曲線が交わる点をCt値（Threshold Cycle）として算出します。
反応後の解析はソフトウエア上で完結し、Ct値が算出できたものをプラス（Posi.）、目的遺伝子が増幅せずCt値が算出できなかったものをマイナス（Nega.）と判定し、装置画面には下の図のように表示されます。



例えば、黄色、茶色、赤色の増幅曲線は、Threshold（紫線）との交点から Ct 値が得られ、判定はプラスとなります。一方、黄緑の増幅曲線は、Threshold（紫線）と交わらないため Ct 値が得られず、マイナスと判定します。

Thermal Cycler Dice® Real Time System *II* の表示画面

総合判定結果の表示について

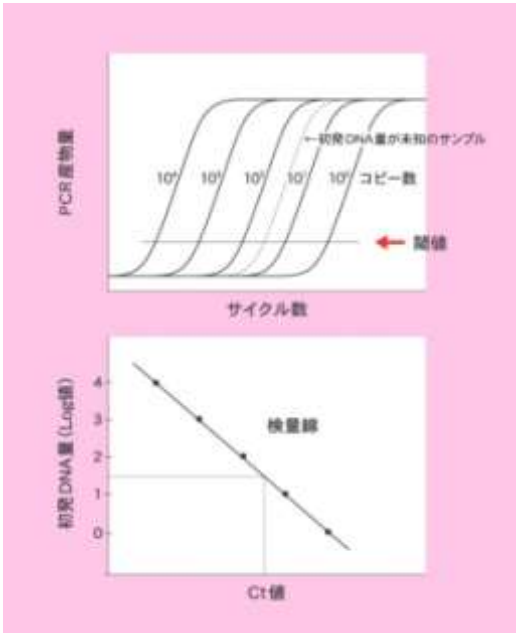
- 陰性コントロール<N>、陽性コントロール< P>の表示

  OK ：反応が正常に進んだ。

  OUT ：反応に問題があった。

- Sample<U>

  Posi.、Nega.、ND、Error

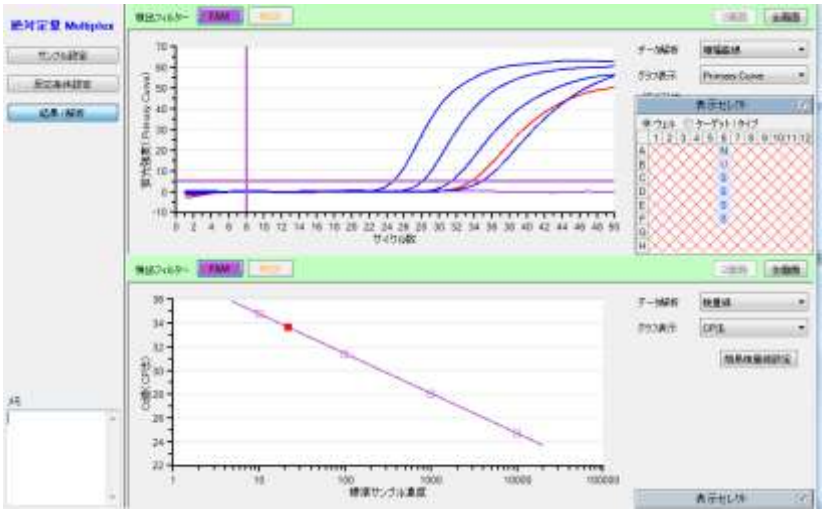


[検量線の作成と定量について]

初発のDNA量が多いほど、増幅曲線が早いサイクルで立ち上がります。段階希釈した標準サンプルを用いてリアルタイムPCRを行うと、初発DNA量が多い順番に等間隔で並んだ増幅曲線が得られます。増幅曲線上に適当な閾値（Threshold）を設定し、閾値と増幅曲線が交わる点をCt値（Threshold Cycle）として算出します。

Ct値と初期鋳型量の間には直線関係があることを利用して検量線を作成し、未知サンプルのCt値をこの検量線に当てはめれば、初期鋳型量を求めることが可能です。

反応後の解析はソフトウエア上で完結し、増幅曲線からCt値を算出し検量線の作成とサンプルの定量結果を表示します。



標準サンプル：青　　未知サンプル：赤

検出フィルター　FAM　ROX　　2画面　全画面

ウェル	サンプルタイプ	検出フィルター	Ct値(CP)	標準サンプル濃	定量値(CP)
A6	NTC	FAM	--	--	--
B6	UNKN	FAM	33.64	--	2.190E+001
C6	STD	FAM	34.82	1.000E+001	9.749E+000
D6	STD	FAM	31.36	1.000E+002	1.046E+002
E6	STD	FAM	28.08	1.000E+003	9.925E+002
F6	STD	FAM	24.72	1.000E+004	9.945E+003

データ解析　テキストレポート
表示形式　ウェル
表示項目　解析条件　CP法データ　SDM法データ
詳細項目

Thermal Cycler Dice® Real Time System *II* の表示画面

[検量線作成用の標準サンプル]

検量線作成用の標準サンプルとしては、目的遺伝子の配列を有しているDNAやRNAが使用できます（プラスミドDNAなど）。
Cycleave®RT-PCR *Cryptosporidium* (18S rRNA) Detection KitおよびCycleave®RT-PCR *Giardia* (18S rRNA) Detection Kitを使用する場合には、キットに添付されているPositive Controlを標準サンプルとして使用することで、オーシスト等を定量することが可能です。

V. 関連製品一覧

■リアルタイム PCR 装置

製品名	用途	製品コード	容量	価格
Thermal Cycler Dice® Real Time System *II*	96 ウェルプレート対応リアルタイム PCR 装置	TP900	一式	¥3,750,000
Thermal Cycler Dice® Real Time System *Lite*	48 ウェルプレート対応リアルタイム PCR 装置	TP700	一式	¥2,300,000

■リアルタイム PCR 装置関連製品（消耗品）

製品名	用途	製品コード	容量	価格
0.2 ml 8-strip tube, individual Flat Caps	独立型キャップ付き 8 連チューブ	NJ600	120 strips	¥18,000

■CycleavePCR キットシリーズ

＜水質検査に＞

製品名	ターゲット	製品コード	容量	価格
Cycleave®RT-PCR *Cryptosporidium* (18S rRNA) Detection Kit	18S rRNA 遺伝子	CY230	50 回	¥67,000
Cycleave®RT-PCR *Giardia* (18S rRNA) Detection Kit	18S rRNA 遺伝子	CY231	50 回	¥67,000
Cycleave®PCR *Legionella* (5S rRNA) Detection Kit Ver.2.0	5S rRNA 遺伝子	CY210	製品名	¥67,000

＜食品検査に＞

製品名	ターゲット	製品コード	容量	価格
Cycleave®PCR O-157 (VT gene) Screening Kit	ベロ毒素遺伝子（VT1, VT2 遺伝子）	CY213	50 回	¥67,000
Cycleave®PCR O-157 (VT gene) Screening Kit Ver.2.0	ベロ毒素遺伝子（VT1, VT2 遺伝子）	CY217A CY217B	50 回 100 回	¥49,500 ¥93,000
Cycleave®PCR O-157 (VT1/VT2) Typing Kit	ベロ毒素遺伝子（VT1 遺伝子、VT2 遺伝子）を識別	CY222	50 回	¥67,000
Cycleave®PCR *Salmonella* Detection Kit Ver.2.0	侵入性因子関連遺伝子 *invA*	CY205	50 回	¥67,000
Cycleave®PCR *Vibrio* (*tdh* gene) Detection Kit	耐熱性溶血遺伝子 *tdh*	CY220	50 回	¥67,000
Cycleave®PCR *Bacillus cereus* (CRS gene) Detection Kit	セレウリド合成酵素遺伝子	CY221	50 回	¥67,000
Cycleave®PCR *Listeria monocytogenes* (*inlA* gene) Detection Kit	Internalin A (*inlA*) 遺伝子	CY223	50 回	¥67,000
Cycleave®PCR *Campylobacter* (*jejuni*／*coli*) Typing Kit	Cytolethal distending toxin 遺伝子の C サブユニット遺伝子 (cdtC gene)	CY225	50 回	¥67,000
Cycleave®PCR *Staphylococcus aureus* (DnaJ gene) Detection Kit	黄色ブドウ球菌の House Keeping 遺伝子のひとつである DnaJ 遺伝子	CY228	50 回	¥67,000
Cycleave®PCR 肉種判別キット(6 種)	肉種判別（ウシ、ブタ、ニワトリ、ウサギ、ウマ、ヒツジ）	CY218	20 サンプル	¥78,000

表示価格はすべて税別です。

【ライセンスについて】

[L4] Quencher ：This product is for measurement of amplification detection for research use only in life sciences research, industrial and environmental testing (including food industry, but excluding bio-terrorism and bio-warfare), non-human animal diagnostic testing, forensic testing and providing services to third parties who do not use the services for the purpose of (a) providing patient management or care, and in which the results of such services are not included in patient records and (b) providing bio-terrorism or bio-warfare testing; and specifically excluding, without limitation: (I) any human clinical, therapeutic or diagnostic uses and animal clinical and therapeutic uses (including any use of the results of any testing performed with any product for patient management or care, or the use of the results of the services for patient management or care) and (II) any research or services where the results of any test or assay are used for patient management, care or otherwise in making therapeutic or treatment decisions for a patient.
A portion of this product is subject to proprietary rights of Epoch Biosciences, Inc. and are made and sold under license from Epoch Biosciences, Inc. under the patents and patent applications (US20020155484, WO0142505, WO02099141, US10/113,445, US09/876,830 and corresponding patents issued in other countries).
There is no implied license for commercial use with respect to this product. A license must be obtained directly from Epoch Biosciences, Inc. with respect to any proposed commercial use of this product, and "commercial use" includes but is not limited to (A) the sale, lease, license or other transfer of this product or any material derived or produced from it, (B) the sale, lease, license or other grant of rights to use this product or any material derived or produced from it, and (C) the sale, lease, license or other transfer of kits which include this product.
[L15] Hot Start PCR ：Licensed under U.S. Patent No. 5,338,671 and 5,587,287 and corresponding patents in other countries.
[L34] ***B. cereus*** ：This product is covered by the claims of U.S. Patent No. 7,264,959 and its foreign counterpart patent claims.
[L42] ***Campylobacter*** **PCR Detection**： This product is sold by Takara Bio Inc. under license from Fuso Pharmaceutical Industries, Ltd. and Osaka Prefecture University. This product is covered by the claims of U.S. Patent No. 7,563,594 and its foreign counterparts.
[L 45] Heated Cover ： This product is covered by the claims of U.S. Patent 5,552,580, and their corresponding foreign counterpart patent claims.
[L47]Real-Time PCR Quantification Method ：The purchase of this product includes a limited, non-transferable license for all fields other than human or veterinary *in vitro* diagnostics under specific claims of U.S. Patent Nos. 6,174,670, 6,569,627, 6,303,305, and 6,503,720, owned by the University of Utah Research Foundation and licensed to Idaho Technology, Inc. and Roche Diagnostics GmbH.

その他のライセンス（最新のライセンス情報）に関しては弊社ウェブサイトにてご確認下さい。

●本冊子で紹介した製品はすべて研究用として販売しております。ヒト、動物への医療、臨床診断用には使用しないようご注意ください。また、食品、化粧品、家庭用品等として使用しないでください。
●タカラバイオの承認を得ずに製品の再販・譲渡、再販・譲渡のための改変、商用製品の製造に使用することは禁止されています。
●本冊子の内容の一部または全部を無断で転載あるいは複製することはご遠慮ください。
●本冊子に記載されている社名および製品名は、特に記載なくても各社の商標または登録商標です。
●本冊子記載の価格は2012年9月1日現在の希望小売価格です。価格に消費税は含まれておりません。

タカラバイオ株式会社

TaKaRa テクニカルサポートライン

TEL. 077-543-6116 FAX. 077-543-1977
東日本支店 TEL. 03-3271-8553 FAX. 03-3271-7282
西日本支店 TEL. 077-565-6969 FAX. 077-565-6995